

·药·学·

古尼虫草与亚香棒虫草亲缘关系初探

罗晖明^{1,2,3} 康 帅¹ 郑 健[△] 王 强² 过立农¹ 林瑞超¹

(1 中国药品生物制品检定所 北京 100050 2 中国药科大学 江苏 南京 210018 ;

3 湖南省药品检验所 湖南 长沙 410001)

摘要 目的 :用分子生物学方法 ,对古尼虫草和亚香棒虫草进行研究 ,对其寄主昆虫 COI(cytochrome oxidase subunit I ,细胞色素氧化酶亚基 I)和真菌 ITS (Internal Transcribed Sequence, 内转录间隔区)区的基因序列进行比较 ,以确定两者亲缘关系。方法 :在古尼虫草和亚香棒虫草性状研究的基础上 ,对两者来源真菌 ITS 区和寄主昆虫 COI 基因进行了 PCR 扩增和序列测定 ,对序列进行比对分析 ,并与 GenBank 核酸序列数据库中的序列进行 BLAST 检索比对。结果 :发现古尼虫草和亚香棒虫草的来源真菌 ITS 区和寄主昆虫 COI 基因序列均有较高相似度。结论 :古尼虫草和亚香棒虫草有较近的亲缘关系。

关键词 :古尼虫草 ;亚香棒虫草 ;亲缘关系 ;ITS ;COI

中图分类号 :S567.35 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)17-3355-04

Preliminary Study on the Phylogenetic Relationship of *Cordyceps Gunnii* and *Cordyceps Hawkesii*LUO Hui-ming^{1,2,3}, KANG Shuai¹, ZHENG Jian[△], WANG Qiang², GUO Li-long¹, LIN Rui-chao¹

(1 National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing, 100050, China;

2 China Pharmaceutical University, Nanjing, 210018, China;

3 Hunan Provincial Institute for Drug Control, Changsha, 410001, China)

ABSTRACT Objective: To determine the genetic relationship between *Cordyceps gunnii* and *Cordyceps hawkesii*, we conducted a comparative study of the rDNA ITS (Internal Transcribed Sequence) regions of sources fungi and COI (cytochrome oxidase subunit I, cell pigment oxidation enzyme subunits I) gene of hostinsects. **Methods:** On the basis of properties research of *Cordyceps gunnii* and *Cordyceps hawkesii*, The rDNA ITS (Internal Transcribed Sequence) regions of sources fungi and COI (cytochrome oxidase subunit I, cell pigment oxidation enzyme subunits I) gene of hostinsects were amplified and sequenced. The sequences were analyzed and compared with sequences in Genbank database. **Results:** For sequences of rDNA ITS regions of sources fungi and COI gene of hostinsects, there are high similarities between *Cordyceps gunnii* and *Cordyceps hawkesii*. **Conclusions:** Close relationship exists in *Cordyceps gunnii* and *Cordyceps hawkesii*.

Key words: *Cordyceps gunnii*; *Cordyceps hawkesii*; Phylogenetic relationship; ITS; COI

Chinese Library Classification(CLC): S567.35 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)17-3355-04

前言

近年来在治疗和保健方面对冬虫夏草的需求不断增加 ,野生虫草资源锐减 ,导致其价格日益攀升 ,伪品也随之增多。常见的伪品有亚香棒虫草、香棒虫草、凉山虫草等^[1]。笔者对收集到的数批伪品进行了初步的生药学鉴定 ,大部分可确定种属 ,其中古尼虫草与亚香棒虫草则存在一定的相似性 ,不易区分 ,我们应用分子生物学方法进一步确定了两者的亲缘关系。

本研究旨在应用 ITS 区与 COI 基因测序相结合 ,分别确定来源真菌和寄主昆虫 ,对两者亲缘关系进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

对照用冬虫夏草无性型菌种中华被毛孢 (*Hirsutella sinensis* X. J. Liu)、亚香棒虫草无性型菌种霍克斯拟青霉 (*Paeicilomyces hawkesii* Z. M. Xiao, T. B. Li & Q. T. Chen)购自广东省微生物所。

古尼虫草与亚香棒虫草样品均保存于中国药品生物制品检定所中药标本馆 ,并已由张继副主任药师鉴定 ,样品信息详见表 1。

1.2 试剂

植物基因组提取试剂盒 (上海捷瑞生物工程有限公司 , Code No. GK1501), PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Code No. DR010B), PrimeSTAR PCR buffer 2.5mmol/L dNTPs , 均购自 Takara 公司。

作者简介 :罗晖明(1980-) 女 ,本科 ,中药师 ,主要研究方向 :中药检定 电话 13671311373 E-mail: biubiu2005@yahoo.com.cn

△通讯作者 :郑健 (1971-),女 ,博士 ,副研究员 ,主要研究方向 :分子生物学 ,中药鉴定 E-mail: zhengjiantt@yahoo.com.cn

(收稿日期 :2011-02-15 接受日期 :2011-03-10)

1.3 方法

1.3.1 提取总基因组 DNA 将样品表面消毒后，在液氮中研成粉末，用植物基因组提取试剂盒提取总基因组 DNA，操作如下：取约 20mg 的粉末置 1.5ml 的离心管中，加入 400 μl PCL 溶液，震荡混匀 1 分钟，加入 15μl Rnase 溶液，充分混匀，置于 65℃水浴约 1 小时至溶液变透明；12,000rpm 离心 5 分钟，吸取上清至 150 μl PP 溶液中，上下颠倒混匀 3~5 次，置于冰上放置 15 分钟；12,000rpm 离心 5 分钟，吸取上清与 600 μl PB 溶

液充分混匀，室温放置 3 分钟；将混合液加入到到吸附柱中，12,000rpm 离心 3 分钟，弃去收集管中废液，将吸附柱放回收集管中，加入 500 μl 漂洗液 Wash Solution，12,000rpm 离心 30 秒，弃去收集管中废液，重复洗脱一次；将柱放回收集管中，12,000rpm 离心 1 分钟后，开盖室温放置以除去残留漂洗液，将吸附柱放入新的洁净 1.5ml 离心管中，在柱中央加入 30 μl 洗脱液 E.B，室温放置 5min，12,000rpm 室温离心 1min，离心管中的液体即为基因组 DNA。

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

品种名称	实验编号	标本编号	收集日期	产地及提供单位等
Name of species	Experiment number	Specimen number	Time of collection	place of origin or supplier
古尼虫草 Cordyceps gunnii	W1	507-064	2009-05	中国药材公司提供
	W2	507-072	2009-05	中国药材公司提供
	W3	507-085	2009-10	北京市药检所提供
	W4	507-097	2005	宁夏区药监局提供
	W5	507-098	2006	安国药材市场收集
	W6	507-100	2008	中检所中药室药材组提供
	W7	507-105	2007	宁夏区药监局提供
	W8	507-159	2009-06	青海冬虫夏草高级培训班收集
	W9	507-174	2010.07.06	新疆区药检所提供
	W10	507-175	2010.07.06	新疆区药检所提供
亚香棒虫草 Cordyceps hawkesii	Y1	cc100523-035	2010-05	河南信阳浉河港镇马家畈村
	Y2	cc100523-036	2010-05	河南信阳浉河港镇马家畈村(蛹)
	Y3	cc100618-027	2010-06	湖南怀化沅陵县赵家山村
	Y4	cc100618-028	2010-07	湖南汉寿龙潭桥
	Y5	507-060	2009-05	中国药材公司提供
	Y6	507-076	2009-07	贵州黔东南州药检所提供
	Y7	507-092	-	河南药检所自禹州市发现
	Y8	507-093	2008	安国药材市场收集
	Y9	507-096	2005	湖南怀化
	Y10	507-157	-	安国药材市场收集

1.3.2 来源真菌 ITS 序列分析 真菌 ITS 通用引物：ITS4 5'-TC-CTCCGCTTATTGATATGC-3'，ITS5 5'-GGAAGTAAAGTCG-TAACAAGG-3'^[2]，由上海捷瑞生物工程有限公司合成。PCR 反应体系 25 μl，含 5× PrimeSTAR PCR buffer 2.5 μl，2.5 mmol/L dNTPs 2 μl，10 μmol/L 引物各 0.5 μl，PrimeSTAR HS DNA Polymerase 0.2 μl，上述总基因组 DNA 25 ng，用 ddH₂O 补足。反应在 ABI Veriti PCR 仪上进行，反应条件：95℃预变性 4 min 后，95℃30 sec，52℃30 sec，72℃1 min 条件下进行 30 个循环，72℃延伸 7 min。将 PCR 扩增产物经电泳检测后委托英潍捷基（上海）贸易有限公司进行序列测定。

1.3.3 寄主昆虫 COI 序列分析

COI 引物：COIa 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTG-3'，COIb 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAAT-3'^[3]，由上海捷瑞生物工程有限公司合成。PCR 反应体系为 25μl 组成同

1.3.2 项下。反应在 ABI Veriti PCR 仪上进行，反应条件：95℃预变性 4min，30 个循环，95℃预变性 4min 后，95℃30sec，56℃30sec，72℃1min 条件下进行 30 个循环，72℃延伸 7min。将 PCR 扩增产物经电泳检测后委托英潍捷基（上海）贸易有限公司进行序列测定。

2 结果

2.1 性状

亚香棒虫草为麦角菌科真菌亚香棒虫草菌 Cordyceps hawkesii Gray 寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座及幼虫尸体的复合体^[4]，古尼虫草为麦角菌科真菌古尼虫草菌 Cordyceps gunnii (Berk.) Berk.寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座与幼虫尸体的复合体^[5]。从性状特征来鉴定，两者的异同详见表 2（如图 1）：

表 2 亚香棒虫草与古尼虫草的性状比较
Table 2 Morphological comparison of Cordyceps hawkesii and Cordyceps gunnii

		亚香棒虫草 Cordyceps hawkesii	古尼虫草 Cordyceps gunnii
子座 stroma	着生部位 Insertion position	自虫体头顶部生出 ,多单生 Growing from the head of the larva corpse ,always has single stroma	同亚香棒虫草 It is similar to Cordyceps hawkesii
	膨大部位 Ascogenous portion	呈柱状或棒状 Columnar or clavate	同亚香棒虫草 It is similar to Cordyceps hawkesii
	横切面 Transverse section	子囊壳层全部埋于子座内 Perithecia are all within the stroma	同亚香棒虫草 It is similar to Cordyceps hawkesii
虫体 caterpillar	色泽 Colour	棕褐色至深褐色 Brown to chocolate	深黄色至棕黄色 Deepyellow to yellowish-brown
	环纹 Veins	背侧环纹清晰 Veins of the dorsal part are clear	环纹不清晰 Veins of the dorsal part are not clear
	毛片特征 Pinaculum character	棕褐色且较厚 Pinacula are brown and thick	不明显 not clear
	腹足 Abdominal leg	微隆起 ,顶面观类扁圆形 A little embossed ,The apical view is oblateness	微隆起或不明显 A little embossed or not clear



图 1 亚香棒虫草与古尼虫草外观 Appearance of Cordyceps hawkesii and Cordyceps gunnii
左 :亚香棒虫草 右 :古尼虫草 Left: Cordyceps hawkesii Right: Cordyceps gunnii

2.2 分子生物学鉴定

2.2.1 来源真菌 ITS 序列测定 分别对中华被毛孢、霍克斯拟青霉菌种 ,及亚香棒虫草(10 批)和古尼虫草(10 批)进行基因组提取 ,扩增 ,PCR 产物纯化测序 ,对序列进行比对分析 ,中华被毛孢和霍克斯拟青霉菌种的 ITS 序列分别与 Genbank 上 Hirsutella sinensis(登录号 AJ309357)^[7]和 Cordyceps hawkesii(登录号 AJ536571)一致。亚香棒虫草与古尼虫草的 ITS 序列与霍克斯拟青霉菌种的相似度达 99%以上 ,但与中华被毛孢菌种的相似度仅 82%。

2.2.2 寄主昆虫 COI 序列分析 分别对亚香棒虫草和古尼虫草各十批进行基因组提取 ,扩增 ,PCR 产物纯化测序 ,利用 Clustal X 软件对选中的序列进行比对分析发现 ,亚香棒虫草和古尼虫草的 COI 序列相似度达 99%以上。将序列与 GenBank 核酸序列数据库中的序列进行 BLAST 检索比对 ,相似度最高者为 Lepidoptera sp.(登录号 HQ570406)且仅 92%。对于亚香棒虫草和古尼虫草 ,分别选取 Y10 和 D4 序列 ,在样品序列比对情况图中列出 ,如图 2。

3 讨论

性状特征结果表明 ,本文研究的古尼虫草虫体较粗壮 ,深黄色至黄棕色 ,且背侧环纹不清晰 ,腹足不明显 ,与亚香棒虫草存在一定差异 ,但两者的子座形态又基本一致。因此需要应用分子生物学方法进一步确定两者亲缘关系。

位于 18s-28s rDNA 之间的 ITS 区(Internal Transcribed Sequence, 内转录间隔区)包括进化上高度保守的 5.8s rDNA 和包含有 rDNA 前体加工信息的两个间隔区 ITS1 ,ITS2。ITS1 和 ITS2 作为非编码区 ,承受的选择压力较小 ,相对变化较大 ,并且能够提供详尽的系统学分析所需要的可遗传性状 ,通过 PCR 扩增可达到鉴定分析的目的。近年来 ITS 区已成为真菌分子生物学研究中的热点^[2,6] ,在虫草属中主要用于无性型鉴别^[7-10]。本文测得亚香棒虫草、古尼虫草的来源真菌序列一致 ,且与冬虫夏草无性型菌种中华被毛孢差异较大 ,说明他们源于同种真菌且可以从 DNA 水平与冬虫夏草区分。

COI 基因(cytochrome oxidase subunit I ,细胞色素氧化酶亚基 I)在线粒体 DNA 中分布普遍 ,具有多态性较高、基因进化速率适中、适于通用引物扩增等特点 ,是昆虫分子系统学研究 中较为理想的分子标记^[11-13] ,该基因近年来在昆虫的群体遗传结构和系统进化方面有较多的研究^[14-17] ,但对虫草属寄主昆虫

COI 的研究报道很少^[18]。本文测得亚香棒虫草、古尼虫草的寄主昆虫 COI 序列也基本一致,说明其寄主为近缘种或同种昆虫。但 Genbank 上虫草属寄主昆虫的 COI 基因数据较少, Hepialus 属仅有一种 Hepialus fusconebulosus (登录号 GU828674),与上述序列差异极大,而鳞翅目 Lepidoptera sp. (登录号 HQ570406)与测得序列相似度为 92%。具体应归属为何种昆虫,有待进一步积累数据,并结合分类学研究加以确定。

梁宗琦等曾报道过古尼虫草 Cordyceps gunnii (Berk.) Berk. , 并认为它与国内记载的亚香棒虫草 Cordyceps hawkesii Gray. 近缘^[19]。在其主编的《中国真菌志》中仅收录了古尼虫草 Cordyceps gunnii (Berk.) Berk. ,且认为 "Cordyceps gunnii (Berk.) Berk.= Cordyceps hawkesii (Gray.) Cooke"^[20] ,这仅从真菌角度阐述了两者的可能关系。本文测得亚香棒虫草、古尼虫草的真菌 ITS 序列和寄主昆虫 COI 序列测定结果相似度极高,进一步说明两者有很近的亲缘关系,鉴于本文古尼虫草实验样本均源于馆藏标本,有待采集新鲜样本对结果进一步确定。

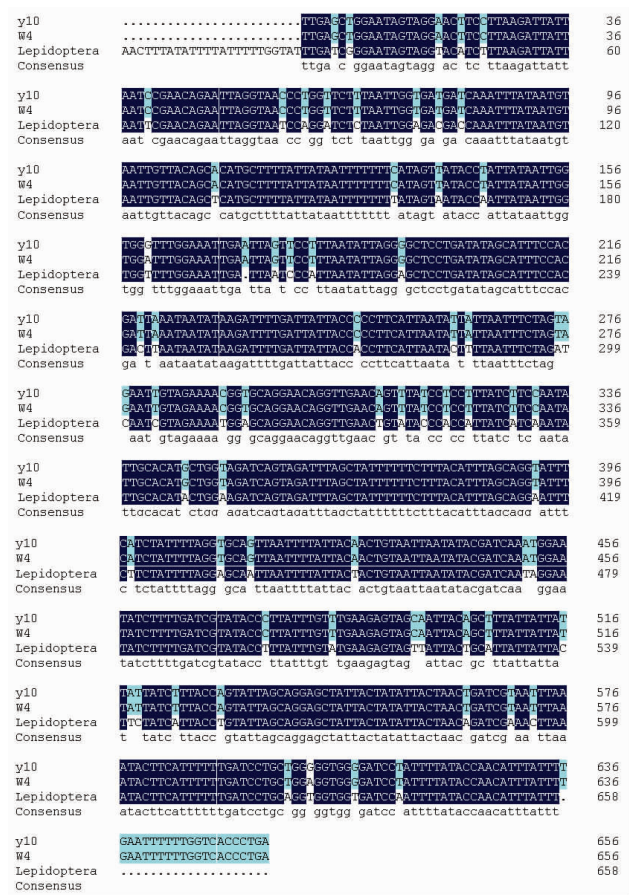


图 2 寄主昆虫 COI 基因序列比对

Fig2 Sequence alignment of COI from hostinsect

注: "-" 比对需要引入的空隙

Note: "-Space denotes for sequence gap

4 展望

虫草生活史的复杂性和形态多样性使得虫草属种的鉴定和分类非常困难。利用核遗传基因的信息,将来源真菌和寄主昆虫结合进行系统分析,从分子水平对其来源进行研究不失为一种新的准确可靠的方法。为了更好的应用这一技术,应在样本

的广度上加以保证,获得具有统计学意义的数据支持。而目前关于寄主昆虫的分子生物学研究还很少,有待加强这方面研究,以丰富相关生物信息资源,为进一步的研究工作奠定基础。目前中药的客观性评价还没有得到国际上的充分认可,分子生物学技术的开发和应用将为完善中药鉴别方法学体系,提高中药检验的客观性评价标准做出应有的贡献,为中药发展指出有开创意义的方向。

参考文献(References)

[1] 雷万生,谢联斌,陈和平.冬虫夏草的研究概况[J].海军医学杂志, 2006,27(3): 91
Lei Wan-sheng, Xie Lian-bin, Chen He-ping.A review of research on Cordyceps Sinensis [J]. Journal of Navy medicine, 2006,27 (3):91(In Chinese)
[2] White T-J, Bruns T, Lee S.Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes[C]. Innis M.A. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York, 1990:15-22
[3] Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotechnol, 1994, 3, 294-299
[4] 吴德龙,王卫芳,薛芳森,等.亚香棒虫草的研究[J].江西农业大学学报,1997,19(2):31-35
Wu De-long,Wang Wei-fang,Xue Fang-sen,et al. Research on Cordyceps gunnii [J].Acta Jiangxi agricultural university,1997,19(2):31-35 (In Chinese)
[5] 陈璐,万德光,国锦琳.冬虫夏草及其混淆品的鉴别[J].时珍国医国药, 2010,21(1):18-20
Chen Lu, Wan De-guang, Guo Jin-lin. Research on Cordyceps Sinensis and its adulterants [J]. Lishizhen medicine and materia medica research, 2010,21(1): 18-20(In Chinese)
[6] Anna Lau, Sharon Chen, Tania Sorrell, et al. Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007,45(2): 380-385
[7] Liu Zuo-yi, Liang Zong-qi, Liu A.Y, et al. Molecular evidence for teleomorph connections in Cordyceps based on ITS-5.8s rDNA sequences[J]. Mycological Research, 2002 106(9):1100-1108
[8] 蒋毅,姚一建.虫草属分子系统学研究现状[J].菌物研究,2004 ,2(1): 58-67
Jiang Yi, Yao Yi-jian. Research status of molecular systematics of Cordyceps[J]. Journal of fungal research, 2004 ,2(1):58-67(In Chinese)
[9] Chen Y.Q, Wang N, Qu L.H, et al. Determination of the anamorph of Cordyceps Sinensis inferred from the analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacers and 5.8S [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2001, 29:597-607
[10] Jiang Y, Yao Y. J. Names related to Cordyceps Sinensis anamorph[J]. Mycotaxon, 2002,84 :245~254.
[11] Mutanen,M., Wahlberg,N. and Kaila,L. Comprehensive gene and taxon coverage elucidates radiation patterns in moths and butterflies [J]. Proc. Biol. Sci, 2010,277 (1695): 2839-2848
[12] Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species[J]. Proc R. Soc. Lond. B(Suppl.), 2003, 270: S96-99

(下转第 3369 页)

参考文献(References)

- [1] Gueth-Hallonet C, Weber K, Osborn M. NuMA: a bipartite nuclear location signal and other functional properties of the tail domain [J]. Exp Cell Res,1996,225(1):207-218
- [2] Haren L, Merdes A. Direct binding of NuMA to tubulin is mediated by a novel sequence motif in the tail domain that bundles and stabilizes microtubules [J]. J Cell Sci, 2002,115(Pt 9):1815-1824
- [3] Lydersen BK, Pettijohn DE. Human-specific nuclear protein that associates with the polar region of the mitotic apparatus: distribution in a human/hamster hybrid cell [J]. Cell,1980,22(2 Pt 2):489-499
- [4] Lee J, Miyano T, Moor RM. Spindle Formation and Dynamics of g-Tubulin and Nuclear Mitotic Apparatus Protein Distribution During Meiosis in Pig and Mouse Oocytes [J]. Biol Reprod,2000,62: 1184-1192
- [5] Merdes A, Ramyar K, Vechio JD, Cleveland DW. A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly [J]. cell, 1996,87:447-458
- [6] Xu XM, Duan X, Lu CF et al. Dynamic distribution of NuMA and microtubules in human fetal fibroblasts, developing oocytes and somatic cell nuclear transferred embryos [J]. Human Reprod,2011,1-9
- [7] Yan LY, Huang JC, Zhu ZY, Lei ZL et al. NuMA distribution and microtubule configuration in rabbit oocytes and cloned embryos [J]. Reproduction,2006, 132(6):869-76
- [8] Merdes A, Cleveland DW. The role of NuMA in the interphase nucleus [J]. J Cell Sci,1998,111:71-79
- [9] Taimen P, Viljamaa M, Kallajoki M. Preferential expression of NuMA in the nuclei of proliferating cells [J]. Exp Cell Res,2000,256:140-149
- [10] Zhong ZS, Zhang G, Meng XQ, et al. Function of donor cell centrosome in intraspecies and interspecies nuclear transfer embryos [J]. Exp Cell Res,2005,30635-30646
- [11] Alvarez Sedó C, Schatten H, Combelles CM, Rawe VY. The nuclear mitotic apparatus (NuMA) protein: localization and dynamics in human oocytes, fertilization and early embryos [J]. Mol Hum Reprod, 2011,17(6):392-398
- [12] Compton, D.A. and Luo, C. Mutation of the predicted p34cdc2 phosphorylation sites in NuMA impair the assembly of the mitotic spindle and block mitosis [J]. J Cell Sci,1995,108: 621-633
- [13] Kammerer S, Roth R B, Hoyal C R, et al, Association of the NuMA region on chromosome 11q13 with breast cancer susceptibility [J], PNAS,2005,102(6):2004-2009
- [14] Briggman J, Genduso R, Camara C, et al. NuMA: evaluation of a new biomarker for the detection of low stage colorectal cancer [J]. Anti-cancer Res, 1999, 19 (4A) : 2411-2414
- [15] Gollin SM. Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: Window to the biology of disease [J]. Head & neck, 2001, 23 (3) : 238-253
- [16] 肖瑾, 万经海, 李长元等. 核有丝分裂器蛋白 NuMA 在人脑胶质瘤中的表达[J]. 安徽医科大学学报, 2007,42(1):42-44
- [17] Simerly C, Dominko T, Navara C et al. Molecular correlates of primate nuclear transfer failures [J]. Science, 2003,300:5617
- [18] Zhou Q, Yang SH, Ding CH et al. A comparative approach to somatic cell nuclear transfer in the rhesus monkey [J]. Hum Reprod,2006,21: 2564-2571
- [19] 周宏灏, 刘洁. 抗肿瘤药物的基因导向性个体化治疗[J]. 肿瘤药学, 2011,1(1):6-11
Zhou Hong-hao, Liu Jie. Gene targeting tailored therapy for the anti-tumor drugs[J]. Anti-tumor Pharmacy, 2011,1(1):6-11
- [13] Pan Cheng-ying, Hu Jing, Zhang xia, et al. The DNA barcoding application of mtDNA COI genes in seven species of Catantopidae (Orthoptera), Entomotaxonomia, 2006,28(2):102-110
- [14] Phylogenetic Signal in the COI, 16S, and 28S Genes for inferring relationships among genera of Microgastrinae (Hymenoptera; Braconidae): evidence of a high diversification rate in this group of parasitoids, Molecular Phylogenetics and Evolution, 1999, 12(3):282-294
- [15] 李青青, 段焰青, 李佛琳, 等. 线粒体基因在鳞翅目昆虫分子系统学中的研究进展[J]. 昆虫知识, 2009,46:372-82
Li Qing-qing, Duan Yan-qing, Li Fuo-lin, et al. Advances in molecular systematics of Lepidoptera using mitochondrial DNA sequences[J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2009,46: 372-82(In Chinese)
- [16] D.H.Lunt, D.-X.Zhang, J.M.Szymura, et al. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies[J]. Insect Molecular Biology, 1996, 5(3): 153-165
- [17] Vandewoestijne S, Baguette M, Brakefield P M, et al . Phylogeography of Aglais urticae (Lepidoptera) based on DNA sequences of the mitochondrial COI gene and control region[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004 , 31: 630-646
- [18] Li Shao-song, Chen Hai, Zhong Xin, et al. Study on COI, COII and Cytb genes in the identification of Hepialus species[C]. The 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, Chengdu, 2010
- [19] 梁宗琦. 一种国内未见报道的虫草菌 - 古尼虫草 [J]. 真菌学报, 1983,2(4):258-259
Liang Zong-qi. A description of Cordyceps gunnii in china [J]. Acta Mycologica Sinica, 1983,2(4):258-259(In Chinese)
- [20] 梁宗琦. 中国真菌志第三十二卷虫草属[M]. 科学出版社, 2007:1
Liang Zong-qi. Flora fungorum sinicorum [M]. Science Press, 2007: 1-190(In Chinese)

(上接第 3358 页)